

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 市 丸 昌 平

主論文 1 編

Hypoxia potentiates anabolic effects of exogenous hyaluronic acid in rat articular cartilage.
International Journal of Molecular Sciences 17(7); 1013, 2016

審 査 結 果 の 要 旨

変形性関節症（osteoarthritis: OA）は、関節軟骨の変性を主体とした退行性疾患である。薬物療法として関節内に投与されたヒアルロン酸（hyaluronic acid: HA）は低下した関節軟骨の潤滑性を回復させる。近年、HA の物理的作用だけでなく分子生物学的作用も明らかにされている。一方、軟骨細胞は無血管組織である関節軟骨内に存在するため低酸素環境下に置かれている。低酸素誘導因子（hypoxia-inducible factor: HIF）-1 α は、軟骨細胞の分化、成熟および維持に必須の転写因子であり OA における軟骨でその発現が増加する。本研究では関節軟骨に対する HA の低酸素環境下での分子生物学的作用を *in vitro* で明らかにすることを目的とした。

申請者は、8 週齢の Wistar ラットを用いた。関節軟骨の組織培養を行い、1%の低酸素環境下で培養した群（hypoxia 群）、HA を添加した群（HA 群）、低酸素環境と HA を併用した群（hypoxia + HA 群）および対照群に分けた。アグリカン、II 型コラーゲンおよび sex-determining region Y box 9（SOX9）の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法で解析した。ウエスタンブロット法で SOX9 および HA binding protein 2（HABP2）の蛋白産生を検討した。ペレット培養を行いサフラニン O 染色および II 型コラーゲンに対する免疫組織化学染色を行った。HA 受容体として CD44, intercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）および hyaluronan-mediated motility receptor（HMMR）の遺伝子発現を検討した。HIF-1 α をノックダウンし CD44 の発現を解析した。

組織培養において、hypoxia+HA 群での II 型コラーゲンおよび SOX9 の遺伝子発現は対照群と比べて有意に亢進した。アグリカンの遺伝子発現ではいずれの群間でも有意差が見られなかった。SOX9 および HABP2 の蛋白産生は hypoxia+HA 群で最も多かった。ペレット培養を用いた軟骨基質産生の評価では、サフラニン O および II 型コラーゲンの染色性が hypoxia+HA 群で最も上昇した。HA 受容体の発現解析において、CD44 の遺伝子発現が低酸素環境下で有意に亢進した。ICAM-1 および HMMR の遺伝子発現に変化を認めなかった。CD44 の遺伝子発現および蛋白産生は HIF-1 α のノックダウンによって有意に抑制された。

軟骨細胞の *in vitro* における軟骨基質代謝の解析には軟骨細胞の三次元環境の維持が重要であるため、本研究では組織培養およびペレット培養を用いた。低酸素環境および HA はそれぞれ単独でアグリカンや II 型コラーゲンなどの軟骨基質代謝を促進する。本研究において、軟骨基質代謝は hypoxia+HA 群で亢進したことから、低酸素環境は HA の軟骨基質代謝作用を促進させることを示した。HA 受容体である CD44 の発現は低酸素環境下で亢進したが、HIF-1 α のノックダウンにより抑制された。HIF-1 α は CD44 の発現を亢進させることで HA との結合親和性を高めた可能性がある。

本研究は、HA が低酸素環境下で軟骨基質代謝作用を促進することを示した点で、医学的に価値ある研究と認める。

平成 28 年 11 月 17 日

審査委員 教授 奥 田 司 ㊞

審査委員 教授 八木田 和 弘 ㊞

審査委員 教授 田 代 啓 ㊞